

【背景および目的】

肝細胞癌（HCC）は近年の治療法の進歩により予後は改善されつつある。しかしながら、根治的外科切除後の累積再発率は5年で約70%とまだまだ高く、新規の予後予測分子と治療標的薬の創出が望まれている。本研究では、HCCにおいて網羅的蛋白発現解析を行ない、予後予測や治療標的の候補となる分子を同定し、その分子の臨床病理学的因子との関連について検討した。

【方法】

1. 網羅的蛋白発現解析

網羅的蛋白発現解析には、根治的外科的切除が行なわれたHCC 11症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い、癌部および非癌部の組織をマニュアルでダイセクションし、組織片をとりだした。組織片から蛋白質を抽出し、トリプシン処理後、消化産物のペプチドを、liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)法で分析した。得られたデータをMASCOTソフトウェアで解析し、スペクトラル・カウント法を用いて癌部と非癌部の蛋白発現を解析した。非癌部と比較して癌部で発現が2倍以上高い蛋白質を癌に関連して発現する分子として抽出した。これらの分子をKEGGデータベースでパスウェイ解析を行ない、病態に関連する候補蛋白質を同定した。次に、癌部と非癌部からtotal RNAを抽出し、同定された分子についてReverse-transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)を行ないmRNAレベルでの発現も確認した。

2. 蛋白発現と臨床病理学的因子と予後との関連

2007年から2010年に日本医科大学付属病院消化器外科にて根治的外科切除を行なったHCC 86症例について候補蛋白質のprotein disulfide-isomerase A3 (PDIA3)の免疫染色を行ない、発現の程度を染色強度（1:weak, 2:moderate, 3:strong）および染色割合（1:<10%, 2:10-50%, 3:>50%）からスコアリングし半定量的に解析をした。そして、その発現程度と臨床病理学的因子および予後との関連を検討した。

3. 蛋白発現と細胞増殖能とアポトーシスとの関連

細胞増殖能およびアポトーシスを、Ki-67の免疫染色とTUNEL法により解析し、蛋白発現との関連を検討した。

【結果】

1. 網羅的蛋白発現解析

LC-MS/MS法で解析を行なったところ、癌部組織より295種類、非癌部より270種類の蛋白質が同定された。そのうち、癌部組織で発現が2倍以上高い蛋白質は142種類であった。パスウェイ解析の結果、antigen processing and presentationのカテゴリーに属する蛋白質が11分子(7.7%)と最も多く、この中でHCCにおける役割が十分明らかとなっていないPDIA3が抽出された。癌部と非癌部におけるPDIA3のmRNA発現をRT-qPCR法で解析したと

ころ、癌部で非癌部と比較して 2.9 倍高値であることが確認された。

2. 蛋白発現と臨床病理学的因子と予後との関連

HCC 86 症例について PDIA3 の発現を免疫染色で検討した。PDIA3 の発現を半定量的にスコアリングしたところ、86 例中 56 例 (65%) でスコアが 5 点以上と PDIA3 が高発現しており、30 例 (35%) でスコアが 4.5 点以下と低発現であった。PDIA3 の発現程度と性別、年齢、感染症、背景肝、腫瘍径、腫瘍数、脈管侵襲、組織型、病期との関連を検討したところ有意な関連は認められなかったが、発現が低い群で腫瘍径が小さく、高分化の癌が少ない傾向がみられた。PDIA3 の高発現と低発現の HCC で、無再発生存は 12.9 ヶ月 vs 29.3 ヶ月、生存率は 23.1 ヶ月 vs 43.7 ヶ月と PDIA3 高発現の症例では有意に経過が不良であった。

3. 蛋白発現と細胞増殖能とアポトーシスとの関連

PDIA3 の高発現と低発現の HCC で、Ki67-index は $25.9 \pm 4.1\%$ vs $13.7 \pm 2.0\%$ 、TUNEL は $2.1 \pm 0.5\%$ vs $8.5 \pm 1.8\%$ と、PDIA3 高発現の症例では有意に Ki67-index が高く、アポトーシスが低下していた。

【考察】

今回 HCC の網羅的蛋白発現解析の結果、protein disulfide-isomerase に属する PDIA3 が抽出された。本研究は、HCC における PDIA3 の発現と臨床病理学的関連に臨床的意義を見出した初めての報告である。PDIA3 は、主に小胞体に存在し、新生蛋白質の折り畳みや、主要組織複合体遺伝子(MHC)-I に関与する。腫瘍では、乳癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌、胃癌で PDIA3 の発現が確認されている。子宮頸部腺癌では、PDIA3 の高発現が予後不良と関連するが、逆に胃癌と子宮頸部扁平上皮癌では PDIA3 の低発現の癌が予後不良である。原発腫瘍や組織型により、PDIA3 の予後への関与が異なる可能性がある。本研究では、HCC において PDIA3 の高発現の癌の予後が不良であることが初めて示された。

PDIA3 は、小胞体ストレス伝達に関連しており、小胞体ストレスによるアポトーシスを抑制する。本研究においても、PDIA3 が高発現の HCC ではアポトーシスが少ないことが示された。HCC の細胞増殖においては mTOR 経路が重要な役割をすることが既に知られている。PDIA3 は mTOR と複合体を形成し、シグナル経路の調節に関与しており、HCC においても PDIA3 が mTOR 経路を介して細胞増殖に関与している可能性が考えられる。HCC における PDIA3 の役割のさらなる解明が必要であるが、PDIA3 は HCC の肝切除後の予後予測因子となるばかりでなく、新規の治療標的分子となる可能性がある。